Louisville APL Diagnostics, Inc.

Revisión #1 – Mayo 1, 2009

REF	LAPL-K-HRP-aβ2GPI-1G

LOUISVILLE APL DIAGNOSTICS, INC.

2622 NASA Pkwy Ste G2, Seabrook TX 77586 USA

LAPL® aβ2GPI HRP IgG ELISA Kit

REF	LAPL-K-HRP-aβ2GPI-1G

Una prueba de Enzimo Inmunoensayo
Para la detección de Anticuerpos Anti-β2 Glicoproteína I IgG

IVD **Para uso Diagnóstico *In Vitro***

Asistencia Técnica
Tel: 770-455-7129
Fax: 770-455-6499
Atención al Cliente: 800-624-3192
USA & Canada solamente
Email: support@louisvilleapl.com
Comentarios: feedback@louisvilleapl.com
Website: www.louisvilleapl.com

Fabricado por:
TheraTest Laboratories, Inc.
1111 North Main Street
Lombard, IL 60148

ES

MANUAL DE INSTRUCCIONES
LAPL® aβ2GPI HRP IgG ELISA Kit

INDICE

Página

1 – Uso al que está destinado 3
2 – Explicación del ensayo 3
3 – Principio del método 4
4 – Componentes 4
4.1 Contenido del *Kit LAPL® aβ2GPI HRP IgG ELISA* 4
4.2 Precauciones 5
4.3 Almacenado y conservación del kit 6
4.4 Recolección y almacenaje de las muestras 6
5 –Procedimiento de la prueba 6
A. Material suministrado 6
B. Material requerido pero no suministrado 7
C. Preparación de Reactivos 7
D. Procedimiento del ensayo 8
E. Notas al procedimiento 9
6 – Cálculo de Resultados 10
A. Determinación de los valores de absorbancia 10
B. Cálculo de la actividad de anticuerpo anti-β2GPI 10
7 – Control de calidad y aceptabilidad de los resultados 10
8 – Limitaciones del procedimiento 11
9 – Valores esperados 11
10 – Guía de intrerpretación 12
Tabla 1: Sensibilidad, especificidad, y acuerdo 13
Tabla 2: Porcentaje de muesras positivas 13
Tabla 3: Distribución de isotipos simples 14
Tabla 4: Relacion entre resultados positivos y negativos 14
Tabla 5: Sensibilidad, especificidad, y acuerdo 15
Figura 2-a: Isotipo IgM 15
Figura 2-b: Isotipo IgG 16
Figura 2-c: Isotipo IgA 16
Figura 3: Relación entre anti-β2GPI y aCL 17
11 – Características 17
11.1 Presición dentro del ensayo 17
11.2 Presición entre ensayos 17
12 – Bibliografía 18

binding. J. Immunol. 154: 954 - 960, 1995

11. Alarcon-Segovia, D. and Cabral, A.R. The antiphospholipid/cofactor syndromes. J. Rheumatol. 23:1319-1322, 1996

12. Fanopoulos, D., Teodorescu, M.R. Varga, J. and Teodorescu, M. High frequency of abnormal levels of IgA anti- β2GPI antibody in SLE patients with antiphospholipid antibody syndrome (data on file and J. Rheumatology, 25: 675-680, 1998

13. Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K, Fujisaku A, Mukai M, Kobayashi S, and Igarashi Y, Koike T: Antibodies to β2-Glycoprotein 1 and clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 39:1466-1474, 1996

14. Cervera R., Font, J., Lopez -Soto, A., Casals, F., Palares, L., Bove, A., Ingelmo, M. and Urbano-Marquez, A. Isotype distribution in systemic lupus erythematosus: prospectivo analysis of a series of 100 patients. Ann. Rheum. Dis. 49:109-113, 1990

15. Molina JF, Gutierrez -Urena S, Molina J, Uribe O, Richards S, DeCeulaer C, Garcia C, Wilson WA, Gharavi, AE and Espinoza LR.Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol, 24: 291-296, 1997

16. Juby, A., Davis, P. , Genge T. ,McElhaney, J. Anticardiolipin antibodies in two elderly populations. Lupus, 4: 482-485, 1995

12 - BIBLIOGRAFIA

1. Schousboe, I: β2-Glycoprotein 1: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood 1985*; vol. 66, n 5: 1086-91

2. Harris, E.N., Hughes, G.R.V.: Thrombosis and miscarriages: the antiphospholipid antibody story. ISI Atlas of Science 1: 155-160, 1988.

3. Loizou, S., Byron, M.A., Engelhart, H.J., David, J., Hughes, G.R.V., Walport, M.S.: Association of quantitativo anticardiolipin antibody levels with fetal loss and time of loss in systemic lupus erythematosus. Q. J. Med. 68: 525-532, 1988.

4. Roubey, R.A.S. Immunology of the antiphospholipid antibody sydrome. Arthr. and Rheum. 39:1444 -1454, 1996

5. Galli, M., Cornfurius, P. Maassen, C., Hemker, H.C., DeBaets, M.H., van Breda-Vriesman, P.J.C., Barbui, T. Zwaal, R.F.A., and Bevers, E.M. Anticardiolipin antibodies directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet 335: 1544-1547, 1990

6. McNeil, H.P., Simpson R.J., Chesterman, C.N. and Krilis, S.A. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: β2 Glycoprotein I (apolipoprotien H). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4120 - 4124, 1990

7. Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa. K., Koike, T. : Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet 336: 177 -178, 1990

8. Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa,K., Suzuki, T. Sumida, T. Yasuda, T., and Koike, T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. J. Immunol. 148: 3885 - 3891, 1992

9. Matsuura, E., Igarashi, Y., Yasuda, T. Triplett, D.A., and Koike, T.. Anticardiolipin antibodies recognize β2-Glycoprotein 1 structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. J. Exp. Med. 179: 457 - 462, 1994

10. Roubey, R.A.S., Eisenberg, R.A., Harper M.F., and Winfield, J.B. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize β2-Glycoprotein 1 in the absence of phospholipid: importance of antigen density and bivalent

1 – USO AL QUE ESTA DESTINADO

El *Kit LAPL® aβ2GPI HRP IgG ELISA* es un test de diagnóstico *in vitro* para la medición de autoanticuerpos IgG en suero humano dirigidos contra la β2glicoproteína I (β2GPI) sérica. Esta medición ayuda en el diagnóstico del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS) o de ciertos desórdenes trombóticos autoinmunes secundarios al lupus eritematoso sistémico (SLE).

2 – EXPLICACION DEL ENSAYO

La β2GPI es un polipéptido de cadena simple con un peso molecular aproximado de 50 kD (no-reducido) y 70 kD (reducido). Está presente en el plasma en una concentración de alrededor de 200 µg/ml. Se ha demostrado que la β2GPI inhibe la vía intrínseca de la coagulación sanguínea, la agregación de plaquetas mediada por ADP, y la actividad protrombinasa de las plaquetas activadas (1).

En general los autoanticuerpos contra fosfolípidos, en particular la cardiolipina, están asociados con trombosis, pérdida fetal recurrente, inflamación del sistema nervioso central, trombocitopenia, y otras manifestaciones. Generalmente se encuentran agrupadas en el denominado síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS) (2, 3,4). La evidencia ha puesto de manifiesto que algunas moléculas de anticuerpo antifosfolípido reconocen la cardiolipina mientras que otras reconocen un complejo formado por cardiolipina y una proteína portadora, β2GPI (5 - 8). Otros estudios han demostrado que gran parte de los anticuerpos reconocen moléculas de β2GPI a una densidad alta (9) bloqueadas a una fase sólida irradiada con rayos X (10).

En estudios recientes se ha demostrado que la medición de anticuerpos IgM e IgG anti-β2GPI puede ser más específica para el diagnóstico de pacientes con APS, que la medición de anticuerpos anticardiolipina (rev. en 4 y 11). Además, se mostró que un gran número de pacientes con SLE tienen IgA anti-β2GPI, lo que está en correlación con su presencia en manifestaciones del APS (12) (Ver Valores Esperados).

La distribución de los isotipos en los pacientes puede variar con el grupo étnico y la manifestación de la enfermedad. Se ha observado que la anticardiolipina IgG y la anti-β2GPI tienen relativamente alta especificidad para el APS (13). Para los anticuerpos anticardiolipina se mostró que la IgG se encuentra como el isotipo dominante en las poblaciones hispana y áfrico-americana, y la IgA en la áfrico- caribeña. Se encontró que la anticardiolipina IgM está asociada a la anemia hemolítica en pacientes españoles (14) y mexicanos (15). Se mostró que el isotipo IgA es el prevalente en pacientes de SLE con manifestaciones del APS (12). La presencia de los tres isotipos de anti-β2GPI tiene una mayor

especificidad para APS que cualquier isotipo aislado (Ver Guía de Interpretación).

3 – PRINCIPIOS DEL METODO

El *Kit LAPL® aβ2GPI HRP IgG ELISA* es un inmunoensayo enzimático de fase sólida. Para la medición de anticuerpos anti- β2GPI, los pocillos (blanco y recubierto de β2GPI) se incuban en paralelo con muestras de sueros diluidos, calibrador, control positivo, y control negativo. Durante la incubación, los anticuerpos presentes en la muestra se unen a la fase sólida.
Luego, los pocillos son lavados y se agregan anticuerpos anti-inmunoglobulina humana, específicos a un isotipo, marcados con peroxidasa de rábano. Después de la incubación con el conjugado enzimático, los anticuerpos marcados no unidos se remueven por aspiración y lavado. Se agrega un cromógeno y la presencia de anticuerpos es detectada por un cambio de color leído en un lector de ELISA. El valor de absorbancia en el pocillo control (blanco) se sustrae del valor obtenido del pocillo recubierto con β2GPI.

4 – COMPONENTES

4.1 Contenido del *Kit LAPL® aβ2GPI HRP IgG ELISA*

Pocillos Recubiertos de Antígeno para la medición isotipo-específica para cada isotipo. Cada unidad de prueba consiste de un par de pocillos. La tira a la izquierda (L), está recubierta con β2GPI y la tira a la derecha (R) sirve como control blanco que va a ser sustraído para obtener una densidad óptica neta (Fig. 1). Una *tira* se define como una columna vertical de ocho pocillos. En cada marco (placa) hay seis tiras de blancos y seis tiras de pocillos recubiertos con β2GPI. Las tiras están organizadas verticalmente en el marco con las orillas orientadas hacia abajo. Se pueden guardar las tiras no utilizadas y el marco para ser utilizadas posteriormente. Se deben colocar en su bolsa con el paquete de desecante, se sella y se almacenan a 2-8°C.

Concentrado de Lavado 10X - Tampón concentrado con Tween 20.

Conjugado Enzimático Anti-IgG - IgG anti-humana (Fcγ específica) conjugada con peroxidasa de rábano (color verde) y 0.2% ProClin 300.

Cromógeno - 3,3'5,5' tetrametilbenzidina en tampón con peróxido de hidrógeno.

Reactivo de Parada - Ácido fosfórico 2M.

Control Positivo - Suero humano conteniendo anticuerpos IgG anti β2GPI y 0.2% ProClin 300. Referirse a la hoja de datos adjunta para las características

Figure 3: Relación entre 100 especímenes con niveles anormales de anticuerpos anticardiolipina y/o anti-β2GPI. Notar la gran similaridad entre los resultados obtenidos entre los dos ensayos como asi también la existencia de especímenes que aparecen como normales en solamente uno de los dos ensayos.

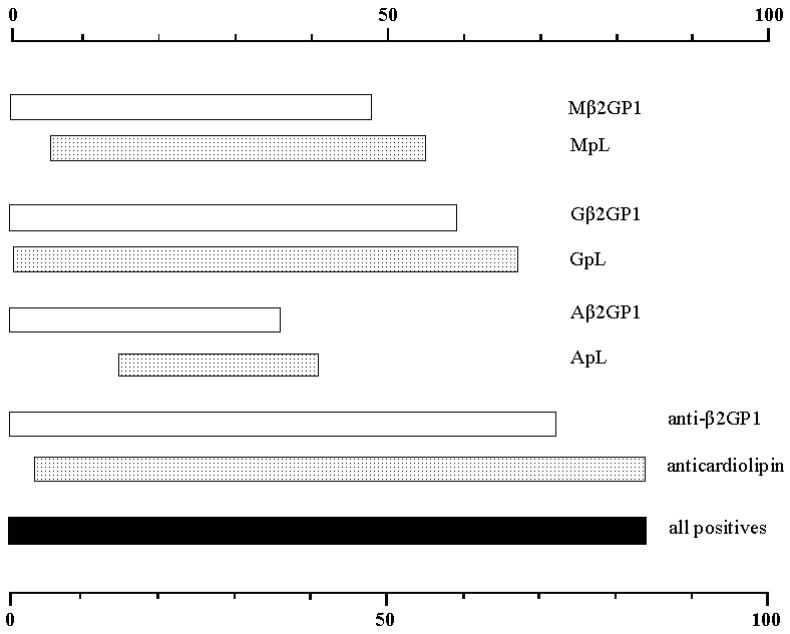

Fig 3

11 - CARACTERISTICAS

11.1 Precisión Dentro del Ensayo:

La precisión dentro de la corrida se determinó ensayando en 42 pares de pocillos, una muestra que contenía autoanticuerpos para cada clase de anticuerpo. Se encontró que el coeficiente de variación para IgM, IgG e IgA anti-β2GPI fue de 6%, 11% y 11% respectivamente.

11.2 Precisión Entre Ensayos:

La precisión entre corridas se determinó ensayando en 20 corridas, muestras que contenían niveles altos y bajos de autoanticuerpos. Se encontró que el coeficiente de variación fue de: IgM 5%; IgG <9% e IgA<11%.

Figura 2-b: Isotipo IgG. Correlación entre los niveles de anti-β2GPI (LAPL® aβ2GPI HRP ELISA Kit, calibración de punto simple) con anticuerpos anticardiolipina (aCL, curva estándar) en especímenes de 100 pacientes con manifestaciones del síndrome antifosfolípido

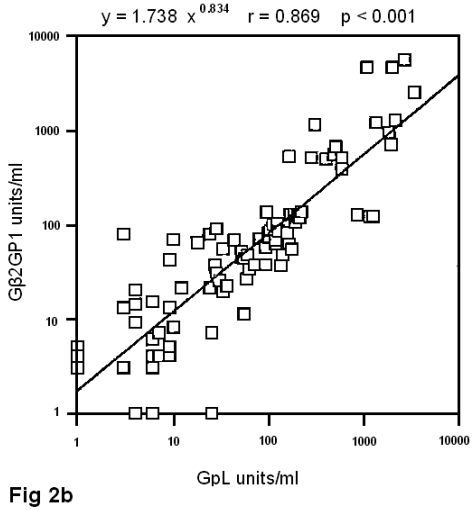

Fig 2b

Figura 2-c: Isotipo IgA. Correlación entre los niveles de anti-β2GPI (LAPL® aβ2GPI HRP ELISA Kit, calibración de punto simple) con anticuerpos anticardiolipina (aCL, curva estándar) en especímenes de 100 pacientes con manifestaciones del síndrome antifosfolípido

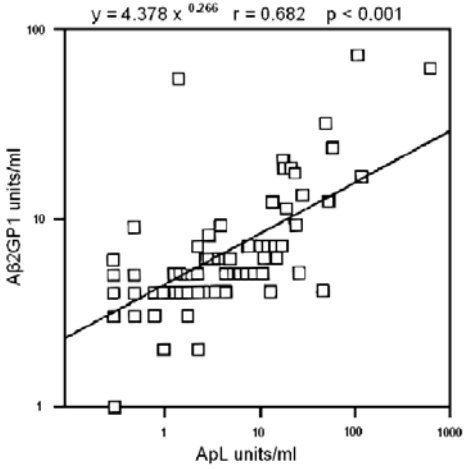

Fig 2c

de su desempeño.

Control Negativo - Suero humano conteniendo 0.2% ProClin 300. Referirse a la hoja de datos adjunta para las características de su desempeño.

Calibrador. El Calibrador contiene suero humano con anticuerpos IgG anti-β2GPI y 0.2% ProClin 300. Referirse a la hoja de datos adjunta para las características de su desempeño.

4.2 Precauciones

1. Solamente para el uso de diagnóstico *in vitro*.
2. No pipetear con la boca.
3. No coma, beba o fume en las áreas se trabajo.
4. Lávese las manos copiosamente después de utilizar especímenes y reactivos del kit.
5. No usar componentes después de la fecha de expiración.
6. No mezclar los reactivos de diferentes lotes.
7. Evite la contaminación microbiana de los reactivos.
8. Evite la exposición de los reactivos a excesivo calor o luz durante su almacenamiento.
9. No permita que el cromógeno tenga contacto con metales o agentes oxidantes.
10. Los sueros utilizados para preparar el Calibrador y los Controles Positivo y Negativo, fueron obtenidos de sangre humana. Cuando fueron probados por métodos aprobados por la FDA, se determinó que no son reactivos a la presencia de HIV (Virus de Inmunodeficiencia Humana), al antígeno de la Hepatitis C y al antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg). Aun así, estos métodos no pueden ofrecer completa seguridad que el HIV, el virus de la hepatitis u otros agentes infecciosos estén ausentes. Estos materiales y todos los especímenes de pacientes se deberán manejar como si fueran capaces de transmitir enfermedades infecciosas.
11. Utilice cristalería descartable o material plástico desechable, o lave todos los materiales de acuerdo a las prácticas de laboratorio aceptadas como normales.

4.3 Almacenado y consevacion del kit

1. Al recibirse, almacene todos los reactivos a 2°-8°C. No congelar los reactivos.
2. Antes de utilizarse, llevar los reactivos a temperatura ambiente (18°-30°C) por 30 minutos.
3. Evite la luz solar directa.
4. La Solución de Lavado, cuando se almacena a 2 - 8°C, es estable hasta la fecha de expiración del kit.

4.4 Recolección y almacenaje de las muestras

No se requiere una preparación especial del paciente. Para evitar la hemólisis, obtenga una muestra de sangre entera utilizando técnicas válidas o aceptadas. Deje que la sangre se coagule y separe el suero por centrifugación dentro de las 24 horas después de la obtención. La hemólisis y la lipemia no afectan el desempeño de la prueba. Si se evita la contaminación microbiana, las muestras se pueden almacenar a 2-8°C hasta diez días. NO CONGELE la sangre que no esté separada. Si el ensayo no se va a realizar dentro de los diez días, después de la obtención de la muestra, el suero debe ser separado del coágulo y almacenado a -20°C. No utilice suero que ha sido descongelado más de una vez o que ha sido inactivado por calor. Las muestras de suero han sido probadas para mostrar su estabilidad a temperatura ambiente y se observó que son estables por cinco días, sin pérdida aparente de la actividad de los anticuerpos.

5 – PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

A. Material suministrado

Item#	Componente	No. / Vol.
1	Placas (12 tiras de 8 pocillos cada una)	2 x 96 pocillos
2	Concentrado de Lavado 10X	1 x 100 ml
3	Conjugado Enzimático anti-IgG	1 x 27 ml
4	Cromógeno	1 x 27 ml
5	Reactivo de Parada	1 x 27 ml
6	Control Positivo IgG	1 x 0.1 ml
7	Control Negativo	1 x 0.1 ml
8	Calibrador IgG	1 x 0.1 ml

Tabla 5: Sensibilidad, especificidad, y acuerdo relativos entre anti-β_2GPI y anticardiolipina (TheraTest EL-ACA), calculado en 140 especímenes probados en paralelo para los dos anticuerpos. Los resultados obtenidos con la prueba de anticardiolipina fueron considerados como 100%. Datos calculados de la Tabla 4 arriba.

Parámetro	IgM %	IgG %	IgA %	Cualquier isotipo %
Sensibilidad	86	85	78	85
Especificidad	91	99	85	87
Acuerdo	90	92	84	87

Figura 2-a: Isotipo IgM. Correlación entre los niveles de anti-β_2GPI (LAPL® aβ_2GPI HRP ELISA Kit, calibración de punto simple) con anticuerpos anticardiolipina (aCL, curva estándar) en especímenes de 100 pacientes con manifestaciones del síndrome antifosfolípido.

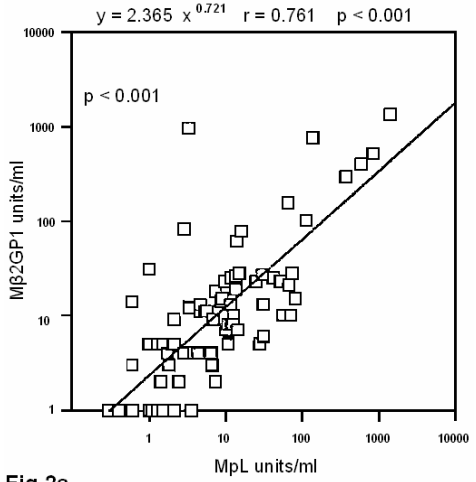

Fig 2a

Tabla 3: Distribución de isotipos simples y combinación de isotipos en 148 especímenes de pacientes: 100 con síndrome antifosfolípido y 48 con SLE.

Isotipo de anticuerpos identificado	No. positivo β_2GPI	No. positivo para β_2GPI con >2 x límite normal
IgM sola	15	5
IgG sola	24	13
IgA sola	17	11
IgM+IgG	12	N/A
IgM+IgA	2	N/A
IgG+IgA	6	N/A
IgM+IgG+IgA	32	N/A

N/A: no aplicable

Tabla 4: Relación entre resultados positivos y negativos de prueba con anticardiolipina y anti-β_2GPI para isotipos IgM, IgG, IgA separados y para cualquier isotipo (IgM, IgG y/o IgA) en 140 especímenes (pacientes con APS y normales).

IgM

		aCL	
		Positivo	Negativo
LAPL® aβ_2GPI HRP ELISA Kit	Positivo	45	7
	Negativo	7	81

IgG

		aCL	
		Positivo	Negativo
LAPL® aβ_2GPI HRP ELISA Kit	Positivo	58	1
	Negativo	10	71

IgA

		aCL	
		Positivo	Negativo
LAPL® aβ_2GPI HRP ELISA Kit	Positivo	21	17
	Negativo	6	96

Cualquier isotipo

		aCL	
		Positivo	Negativo
LAPL® aβ_2GPI HRP ELISA Kit	Positivo	67	8
	Negativo	12	53

B. Material requerido pero no suministrado

- Micropipetas de precisión que descarguen 10 µl, 100 µl y 1 ml (±2%) con puntas de plástico desechables
- Pipetas multicanal ajustables (8 or 12 canales)
- Puntas de pipeta (tips)
- Tubos de ensayo
- Cronómetro
- Pipetas (1ml, 5ml y 10ml)
- Reservorio para pipetear reactivos con pipeta
- Espectrofotómetro para placas de microtitulación de 96 pocillos, de longitud de onda simple o doble (lectora de ELISA)
- Dispositivo de vacío con trampa ajustado con una pipeta Pasteur para la aspiración de los pocillos (opcional)
- Agua Desionizada (Utilice agua CAP Tipo I o grado USP)

C. Preparación de Reactivos:

1. **Solución de Lavado** - Cuando el Concentrado de Lavado 10X se almacena en frío, puede ocurrir cristalización. Para mejores resultados, diluya 1:10 la botella entera y revise que no haya cristales antes de utilizarse. Si se almacena a 2°-8°C, la Solución de Lavado es estable hasta la fecha de expiración del kit. El tampón de lavado diluido también se utiliza como diluyente de especímenes.
2. **Cromógeno -** Para manejar la solución de cromógeno se debe utilizar cristalería o material de plástico desechables. Alternativamente, todo el material no desechable empleado debe ser lavado copiosamente de acuerdo a las prácticas generales de laboratorio. Evite la contaminación y vuelva a poner el cromógeno sobrante en su botella original. No utilice cromógeno que ha cambiado de color a azul.
3. **Especímenes, Control Positivo, y Control Negativo** - Los Especímenes y Controles deben de ser diluidos 1/100 antes de utilizarse. Utilice pipetas de alta precisión. Por ejemplo, pipetee 10 µl de suero en 990 µl (o 1 ml) de tampón de lavado diluido (dilución 1/100). Deseche cualquier muestra diluida que no se utilizó después de que el procedimiento de la prueba se ha completado.
4. **Calibrador β_2GPI -** El Calibrador debe diluirse 1/100 para pruebas con un punto de calibración.

D. Procedimiento Del Ensayo

Referirse al ejemplo sugerido en Fig. 1

1. Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (18°-25°C) antes de utilizarse.
2. El Calibrador y los Controles Positivo y Negativo deben incluirse en todos los ensayos.
3. Marque las posiciones de las muestras (por ejemplo, Calibrador, Control Positivo, Control Negativo, y Especímenes) en la hoja de trabajo.
4. Determine el número de tiras necesarias. Las tiras no utilizadas deben guardarse en la bolsa y ésta sellarse para su uso posterior.
5. Diluya todas las muestras, calibrador, y controles 1/100 (por ejemplo: 10 µl en 990 µl o 1 ml) en tampón de lavado diluido y mezcle bien.
   Pipetee 100 µl del calibrador y los controles diluidos en cada par de pocillo (pocillo recubierto con antígeno y blanco de muestra).
   Pipetee 100 µl de cada muestra diluida en cada par de pocillo (pocillo recubierto con antígeno y blanco de muestra). Para mejores resultados pipetee todos los materiales en un plazo no mayor de 5 minutos del inicio del ensayo. Este paso se facilita utilizando pipetas multicanal o pipeteadores repetitivos.
6. Incube la placa por 30 (± 5) minutos a temperatura ambiente (18°-25°C). Aspire o decante la Muestra de todos los pocillos y lave la placa tres veces con 200-400µl de solución de lavado. Se puede utilizar en estre paso una lavadora automática de placas.
7. Pipetee 100 µl de los Conjugados Enzimáticos apropiados en cada pocillo. Complete este paso dentro de 5 minutos, para la corrida entera.
8. Incube por 30 (± 5) minutos a temperatura ambiente (18°-25°C).
9. Aspire o decante los Conjugados Enzimáticos de todos los pocillos y lave la placa como se indica en el paso 6 arriba.
10. Dispense 100 µl de cromógeno en cada pocillo. Incube la placa por 15(±1) min. a temperatura ambiente(18-30°C). Los pocillos recubiertos con β_2 GPI, incubados con el Control Positivo y el Calibrador, van a desarrollar un color azul.
11. Pipetee 100 µl de Reactivo de Parada en cada pocillo y mezcle golpeando levemente el lado de la placa. El color azul cambia a amarillo.
12. Determine la absorbancia de cada pocillo a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de longitud de onda simple o doble (lectora de ELISA). Los valores de absorbancia deberán medirse dentro los 30 minutos siguientes al término del ensayo. Para lecturas dobles, ajuste el blanco a 630nm. Siga las instrucciones provistas con su instrumento.

Tabla 1: Sensibilidad, especificidad y acuerdo para APS de la prueba anti-β_2GPI

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Parámetro	IgM	IgG	IgA	Cualquier isotipo	Cualquier dos isotipos	Nivel alto cualquier isotipo*	col. 7 y/o col. 9	M+G+A juntas **
Sensibilidad	58	72	45	88	55	67	75	37
Especificidad (BBD)***	98	99	97	96	99	99	99	100
Especificidad Dis. Cont.	85	95	92	76	96	94	93	98
Acuerdo	75	84	51	85	N/A	N/A	N/A	N/A

* Es considerado nivel alto: >10 Mβ_2GPIU/ml, >40 de Gβ_2GPI U/ml o >10 de Aβ_2GPI U/ml

** Arriba de los niveles normales de anticuerpos IgM, IgG e IgA anti-β_2GPI.

*** Blood Bank Donors (Donadores de Bancos de Sangre)

Los anticuerpos contra β_2 GPI pueden encontrarse en otros pacientes con enfermedad vascular del colágeno (Tabla 2). También se encuentran en pacientes con sífilis, aunque con menor frecuencia que anticardiolipina. Por lo tanto, en estos pacientes también se debe de conocer la serología para sífilis. Se pueden encontrar como con un solo isotipo o como combinaciones de dos o tres isotipos (Tabla 3). La mayoría de pacientes probados tuvo ambos anticuerpos, anticardiolipina y anti-β_2 GPI (Tabla 4)

Tabla 2: Porcentajes de muestras positivas para anticuerpos IgM, IgG e IgA anti-. β_2GPI (Ver Tabla 1 para sensibilidad y especificidad de la enfermedad)

Diagnóstico	Número de pruebas	Anti-β_2GPI % positivo			
		IgM	IgG	IgA	IgM, IgG, IgA (Cualquier isotipo)
Donador banco de sangre	100	2	1	1	4
Sífilis	86	9	12	9	18
Artritis Reumatoidea	50	14	6	12	20
Escleroderma	44	11	4	0	14
APS clínico	100	48	59	36	72
SLE	48	27	25	58	73
SLE con historial de APS	28	25	25	75	82
SLE con historial de APS severo *	17*	29	35	81	94

APS= síndrome antifosfolípido; la sensibilidad de la prueba de anticuerpo anticardiolipina para el mismo grupo fue de 78% (para detalles refiérase también a la Fig. 3 adjunta).
*subgrupo de l grupo de 28 pacientes en la línea superior, con SLE e historial de APS

10 – GUIA DE INTERPRETACION

La sensibilidad clínica esperada en esta prueba para pacientes con APS se muestra en las Tablas 1-2. Estudios previos han mostrado sensibilidades para IgM e IgG dentro del mismo rango con especificidades de >80% para APS (13). La sensibilidad para APS en pacientes de SLE con manifestaciones severas del síndrome es >90%, cuando la IgA es también considerada junto con la IgM e IgG (12). En 100 especímenes de pacientes que se esperaba tuvieran el síndrome de anti-fosfolípido hubo una alta correlación y una gran concordancia entre los niveles de anticardiolipina y anti-β_2GPI (Figs. 2 y 3) ($p<0.001$ para los tres isotipos).

Para calcular la sensibilidad de la enfermedad, todos los pacientes en el estudio que cumplieron con la definición de síndrome antifosfolípido (N=87), por ejemplo: manifestación(es) clínicas más la presencia de anticuerpos anti-cardiolipina (11), se consideraron como el 100%.
La especificidad para APS se calculó con dos sets de controles:

a) donadores de banco de sangre (N=100) y
b) pacientes con enfermedades vasculares del colágeno: (50 con artritis reumatoidea) + (44 con escleroderma) + (20 con SLE sin manifestaciones de APS) (total N=114).

La concordancia se calculó considerando como 100% todos los pacientes que tenían manifestaciones clínicas de síndrome antifosfolípido y por lo menos uno de los dos anticuerpos específicos, anticardiolipina o anti-β_2 GPI (N=105). La mejor sensibilidad y acuerdo se obtuvo cuando la muestra era positiva para por lo menos un isotipo (cualquier isotipo) (88% y 85%, respectivamente). La mejor especificidad se observó cuando la muestra era positiva para los tres isotipos y los pacientes fueron comparados con donadores normales (100%) o controles con enfermedades (98%). El nivel de anticuerpo también fue importante al mostrar una especificidad relativamente alta (Tabla 1, col.7).

E. Notas al Procedimiento

Almacenaje - Guarde las tiras no utilizadas en la bolsa con desecante y selle la bolsa. Almacene a 2-8°C.

Lavado - Cada fila de pocillos puede ser lavada con un pipeteador multicanal. Los pocillos pueden ser aspirados utilizando un aparato apropiado de vacío ajustado con una pipeta Pasteur. Alternativamente se pueden utilizar sistemas de lavado semiautomáticos comerciales. Independientemente del método, deje secar los pocillos sobre papel absorbente después del lavado final. Solamente utilice agua grado reactivo (CAP tipo 1 o grado USP).

Fig. 1 Ejemplo ubicación del Calibrador, Control Positivo y Control Negativo

Pipeteo - Para evitar la contaminación entre muestras, es esencial pipetear el control positivo, el control negativo, el calibrador, y los especímenes de prueba con puntas de pipeta diferentes. Utilice un pipeteador multicanal calibrado para pipetear el conjugado enzimático, la solución de lavado, el cromógeno, y el reactivo de parada.

Arreglo de Placas - Para minimizar la confusión que resulta del desajuste de las tiras del marco, escriba un símbolo que identifique la naturaleza de las tiras en la orilla texturizada antes de empezar el ensayo.

6 - CALCULO DE RESULTADOS

La mayoría de lectoras de ELISA son compatibles con computadoras y los datos se pueden calcular con la ayuda de programas para computadora. Revise periódicamente que el programa escogido muestre los mismos resultados que los obtenidos por cálculos manuales (validación).

A. Determinación de los valores de absorbancia:

La absorbancia neta para cada muestra es calculada sustrayendo el valor de absorbancia del pocillo blanco (R) del valor de absorbancia del pocillo recubierto con antígeno (L). Para pruebas específicas de clase, cada muestra tiene un blanco por separado, y es sustraído para obtener la absorbancia neta.

Ejemplo:
Absorbancia para el pocillo blanco = 0.150
Absorbancia de la Muestra en el pocillo recubierto con β_2GPI = 1.150
Absorbancia neta de la anti-β_2GPI es 1.150 - 0.150 = 1.000

Nota: Si la absorbancia en el pocillo blanco es mayor que en el pocillo recubierto con β_2GPI, la absorbancia neta se debe de considerar como cero.

B. Cálculo de la actividad de anticuerpo anti-β_2GPI

El cálculo de X unidades de anticuerpo en la muestra se basa en el principio siguiente:

$$\frac{\textbf{Unidades en el Calibrator}}{\textbf{Valor neto de Absorbancia del Calibrator}} = \frac{\textbf{X (Unidades de la muestra)}}{\textbf{Valor neto de Absorbancia de la muestra}}$$

Con esta fórmula se calcula un Factor de Conversión.

1) Factor de Conversión = $\frac{\text{Número unidades anti-}\beta_2\text{GPI en calibrador}}{\text{Valor neto de absorbancia del calibrador (D.O.)}}$

2) Factor de Conversión X absorbancia de la muestra = número de unidades de la muestra.

El desempeño de los calibradores y controles se provee en la hoja de datos dentro del kit en uso. Si el valor de absorbancia de una muestra es igual o mayor de 2.0, ésta deberá ser diluida al menos 1/10 adicional y deberá volverse a probar. De otra manera el resultado deberá reportarse como >n.

7 – CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE RESULTADOS

Los Controles Positivo y Negativo deben correrse cada vez que se realice el ensayo. El rango de valores de absorbancia de los Calibradores y el rango de unidades para los Controles deben estar dentro del rango determinado en la hoja de datos adjunta. Si los valores obtenidos están fuera de este rango, la corrida entera se debe descartar y la prueba se debe repetir.

8 - LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1) El diagnóstico no deberá basarse exclusivamente en el resultado positivo del ensayo. Los resultados deben interpretarse en conjunción con toda la información clínica a disposición del médico (historial del paciente, exámen físico y otros procedimientos de diagnóstico).
2) El tratamiento del paciente no se debe iniciar solamente sobre la base en una prueba positiva para β_2GPI. La información clínica de apoyo deberá estar disponible.
3) Los pacientes con serología positiva para Sífilis incluyendo la prueba de fluorescencia, también pueden ser positivos para anticuerpos anti-β2 GPI. Se debe conocer la serología para Sífilis si una muestra es anormal.
4) Como para cualquier inmunoensayo indirecto de fase sólida, el factor reumatoide de cualquier isotipo puede reaccionar con IgG unida a la fase sólida, en la forma de anticuerpo anti–β_2GPI. Sin embargo, si la IgG anti-β_2GPI no está presente, el factor reumatoideo no reacciona con los pocillos recubiertos de antígeno.
5) Individualmente, cada laboratorio debe verificar los valores normales de los diferentes isotipo, ya que estos pueden variar con la edad y los grupos étnicos. Sin embargo, los valores anormales en personas mayores no se deben atribuir solamente a la edad (16).

9 - VALORES ESPERADOS

Se probaron sueros de 100 donadores de sangre al azar y se determinaron los siguientes límites superiores para normales, para un corte a 98-99 percentil para cada isotipo.
IgG anti-β_2GPI - 25 Gβ_2GPI unidades/ml*

Las unidades son las mismas que las utilizadas para anticuerpos anticardiolipina (Louisville APL Diagnostics, Inc., Seabrook, Texas) (referirse a la hoja de datos adjunta para los valores sugeridos actualmente). Los mismos estándares se han utilizado para calibrar las unidades de anticuerpo anti-β_2GPI Para cada isotipo, 1U/ml. de anticardiolipina es considerada igual a 1 U/ml de anti-β_2GPI.

Los especímenes se deben considerar en el área "gris" del rango positivo como sigue: IgG de 25-40 unidades . Estos resultados se deben informar como positivos límite y se recomienda al médico considerar la repetición de la prueba en 4-8 semanas. Es considerado nivel alto: >40 de Gβ_2GPI U/ml.